

Title	超好熱菌由来蛋白質の構造安定性の解析とその応用
Author(s)	向山, 厚
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48498">https://hdl.handle.net/11094/48498</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">こちら</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	むかい 向 やま 山 あつし 厚
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 1 1 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科物質・生命工学専攻
学 位 論 文 名	超好熱菌由来蛋白質の構造安定性の解析とその応用 Studies on the conformational stability of protein from a hyperthermophilic archaeon and its application
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金谷 茂則  (副査) 教 授 福住 俊一    教 授 宮田 幹二    教 授 菊地 和也 教 授 高井 義造    教 授 伊東 一良    教 授 渡部 平司 教 授 兼松 泰男    教 授 卜部 格

### 論 文 内 容 の 要 旨

ヒトゲノムが解読された今日、生命活動の全般を担う蛋白質を理解することの重要性は日増しに高くなっている。蛋白質はそのアミノ酸配列に起因して固有の立体構造を形成し、機能を発揮する。そのため、蛋白質がどのような仕組みで形成されるのか、また、維持されているのかといった蛋白質の構造と機能特徴づける構造物性を理解することが蛋白質を本質的に理解するうえで非常に重要である。

このような蛋白質の構造物性に関する研究はこれまでに幾つかの蛋白質について調べられ、重要な知見が得られているが、まだ不明な点が多い。また、種々の疾病の原因と考えられているアミロイド線維の形成は蛋白質の天然状態の不安定化などが引き金となることで引き起こされると考えられている。つまり、蛋白質の構造特性を理解することができれば、医薬・産業分野への貢献も計り知れない。そこで本研究では、90℃以上の高温環境下で生育する微生物、超好熱菌が産出する蛋白質に着目し、その安定化機構を調べることを目的とした。超好熱菌由来蛋白質は常温生物由来蛋白質よりも安定であるが、その安定化メカニズムは完全には明らかになっていない。これは安定性の研究に適したモデル蛋白質が少ないことが原因のひとつとなっている。さらに超好熱菌由来蛋白質は常温生物由来の蛋白質とは異なる構造物性を示すと考えられるため、その研究により新たな知見の発掘やこれまでに得られている知見の一般化、その特性を利用した応用研究などが期待できる。

本研究で研究対象として用いた蛋白質は生育至適温度が約 90℃の超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来リボヌクレアーゼ HII (*Tk*-RNase HII) で、この蛋白質は溶液中で単量体として存在し、その結晶構造がすでに決定されている。また、リボヌクレアーゼ H (RNase H) は  $Mg^{2+}$  や  $Mn^{2+}$  などの二価金属イオン存在下で、RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを塩基非特異的に切断して、5' 位にリン酸基、3' 位に水酸基を持つ RNA オリゴマーを生成するエンドヌクレアーゼで、細胞の正常な生育に必須の酵素であるため生物界に普遍的に存在することから、本研究を遂行するのに適した蛋白質であるといえる。

第一章では、*Tk*-RNase HII の構造安定性や変性過程を物理化学的に解析し、*Tk*-RNase HII が超好熱菌由来蛋白質の安定性研究に適したモデル蛋白質であること、常温菌や好熱菌由来蛋白質の RNase H と比較することで、超好

熱菌由来蛋白質に特徴的な安定化機構を見出した。第二章では、*Tk*-RNase HII の高い安定性などの諸特性を利用して、C 末端領域にアミロイド線維の形成に重要であるとされるアミノ酸配列を導入した融合蛋白質の構造解析を行い、凝集性の配列の水溶液中での構造の解明に成功した。第三、四章では、*Tk*-RNase HII の活性部位が安定性の観点から見れば至適でないこと、および低分子化合物によって *Tk*-RNase HII が安定化されることを明らかにした。また、これらの特徴が超好熱菌由来蛋白質だけでなく、すべての蛋白質において成り立つことを提唱した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、熱力学や速度論の観点から超好熱菌由来蛋白質の安定性を解析することにより、超好熱菌由来の非常に安定な蛋白質の構造構築機構に関して基本的な理解を得ることができた点で意義深い。第一章では、超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来リボヌクレアーゼ HII (*Tk*-RNase HII) の構造安定性や変性過程を物理化学的に解析し、*Tk*-RNase HII が超好熱菌由来蛋白質の安定性研究に適したモデル蛋白質であること、そして、常温菌や好熱菌由来蛋白質の RNase H と比較することで、平衡論的にも速度論的にも安定化していることを明らかにしている。

(超) 好熱菌由来蛋白質が中温生物由来の蛋白質よりも平衡論的に安定であることはよく知られている。以上のことから、速度論的な安定化メカニズムは超好熱菌由来の蛋白質に特徴的であることを提案している。第二章では、*Tk*-RNase HII の高い構造安定性を利用することにより、アルツハイマー病における老人斑の主成分である A $\beta$  において、アミロイド繊維形成に重要な配列とされる Tyr 10-Val 24 (A $\beta$  10-24) と Lys 28-Ala 42 (A $\beta$  28-42) の水溶液中での構造特性を解析した。*Tk*-RNase HII の C 末端領域に A $\beta$  10-24 や A $\beta$  28-42 を導入した融合蛋白質のアミロイド形成能や X 線構造解析の結果から、水溶液中ではまず A $\beta$  28-42 が  $\beta$  構造へと変化し、それに伴い A $\beta$  10-24 が  $\beta$  構造をとり、不溶性のアミロイド線維が形成されるというアミロイド線維形成機構を提案している。第三章では、*Tk*-RNase HII の活性部位を構成する 4 つの酸性残基はいずれも構造安定性の観点から見れば至適でないことを示している。このことから、*Tk*-RNase HII は機能を獲得するために構造安定性を犠牲にしていることを示している。第四章では、*Tk*-RNase HII が低分子化合物によって安定化することを示している。この結果は、実際の生体内では様々な低分子化合物が *Tk*-RNase HII はじめ細胞質蛋白質の構造安定性に影響を与えていることを示唆している。また、第三、四章で得られた知見はこれまでに幾つかの中温生物由来の蛋白質について報告されているので、これらが本質的に全ての蛋白質で成り立つことを提案している。

以上のように、本論文はこれまでほとんど行われてこなかった、超好熱菌由来蛋白質の構造安定化機構を定量的に解析することにより、超好熱菌由来蛋白質の安定化機構およびそれらの蛋白質にとどまらない蛋白質全般の構造構築機構の理解に新たな知見を与えたものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。